 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.09.20 J South Med Univ, 2016, 36(9): 1276-1280

临床研究

汉族人群维生素D受体基因Fok I多态性与特发性早产的相关性

蔡 蔚,沈小雅,朱宝平,潘石蕾
南方医科大学珠江医院妇产科,广东 广州 510282

摘要:目的 探讨维生素D受体(VDR)基因Fok I位点多态性与早产发生风险的相关性,为临床上治疗和预防先兆早产或早产发生寻找新途径,改善母婴结局。**方法** 纳入早产患者57例和足月妊娠分娩患者84例。VDR基因Fok I位点基因型采用聚合酶链反应-限制性片断长度多态(PCR-RFLP)法检测基因多态性。**结果** 早产组与足月妊娠分娩组在血细胞比容(HCT)、D-二聚体、纤维蛋白原、血清钙、白细胞、糖化血红蛋白间未见明显差异(P>0.05)。早产组VDR基因Fok I基因型分布和F/f等位基因频率与足月妊娠分娩组相比较,两者间的差异有统计学意义(P<0.05)。早产组中FF基因型频率明显高于足月组,以Ff和ff基因型为对照,FF基因型发生早产的风险增加(χ^2=9.701,P=0.002,OR=3.320,95% CI 1.560-7.066)。而早产组中,上述各临床指标在不同基因型间并未存在明显统计学差异(P>0.05)。**结论** VDR基因Fok I位点多态性与早产遗传易感性相关,FF基因型可能是早产发生潜在的高危因素。

关键词:早产;维生素D受体基因;Fok I多态性

Relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and preterm birth

CAI Wei, SHEN Xiaoya, ZHU Baoping, PAN Shilei
Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To explore the relationship between vitamin D receptor (VDR) gene pol-ymorphisms at Fok I site and the risk of preterm birth for potential intervention of of preterm birth or threatened premature delivery. **Methods** Fifty-seven women with preterm birth and 84 with full-term birth were included in this analysis. Polymerase chain reaction-restriction frag-ment length polymorphism (PCR-RFLP) was performed to identify VDR gene Fok I geno-types. **Results** No significant difference was found in age, D-dimer (DDI), fibrinogen (Fg), serum calcium (Ca^{2+}), leukocyte count or glycosylated hemoglobin (HbA1c) level between the women in the preterm and full-term birth groups (P>0.05). The two groups differed signifi-cantly in the distribution of VDR gene Fok I site genotypes and allele frequency of F/F (P<0.05).The frequency of FF genotype was significantly higher in the preterm group than in the full-term group. Compared with Ff and ff genotypes, FF genotype was associated with an in-creased risk of preterm delivery (χ^2=9.701, P=9.701, OR=3.320, 95% CI [1.560, 7.066]). In the preterm group, the maternal age, DDI, Fg, serum Ca^{2+}, leukocyte count or HbA1c did not differ significantly between the genotypes (P>0.05). **Conclusion** VDR gene Fok I site geno-types are related with preterm birth, and the FF genotype may serve as a potential risk factor for preterm birth.

Key words: preterm birth; vitamin D receptor gene; Fok I site polymorphism

早产是指妊娠满28周至不足37周间分娩者[1],是妊娠期常见的严重并发症,是导致孕产妇及新生儿不良结局的重要影响因素,可对家庭及社会医疗造成严重负担。既往研究提示早产的发生与多种因素有关,但是其病因并未完全明确。维生素D通过维生素D受体基因在人体内发挥其作用,近期研究表明人体内维生素D的状态、维生素D受体基因多态性与2型糖尿病、癌症等多种疾病的发生有关[2],同时也与胰岛素抵抗[3]、妊娠期糖尿病[4-7]、子痫前期[8-10]、早产[11-12]等有关。Wagner团队[13]的研究表明孕期补充维生素D(分别2000和4000 U/d)可以有效地减少感染、先兆早产和早产发生的风险。Lisa等[14]研究指出母体内缺乏维生素D以及缺乏程度不同还会导致早产的分型不同。这在一定程度上均提示人体内维生素D代谢系统与早产发生存在一定的相关性。Lauren等[15]科学家在对以色列人群中妊娠妇女发生早产的相关研究中发现,以色列人群的维生素D核受体基因Fok I位点多态性与自发性、特发性早产的发生有关,该研究提示在以色列人种中VDR基因多态性与早产遗传易感性相关,但该研究是针对以色列人群,且纳入研究的人群样本量较少。我们想了解在亚洲人种中广州地区妊娠妇女人群的VDR基因位点多态性与早产发生风险是否存在相关

收稿日期:2016-03-07
作者简介:蔡 蔚,硕士研究生,E-mail: caiwei_smu@163.com
通信作者:潘石蕾,副教授,硕士生导师,电话:020-61643362,E-mail: panshilei81@163.com

性，并为后续相关研究和早产精准医疗诊治提供理论依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

1.1.1 早产组 纳入标准：根据《妇产科学（第八版）》教材，根据末次月经和妊娠早期B超核算孕周后，将分娩孕周为28~36^{+6}周定义为早产，同时排除其他高危因素所致的早产，如全身感染或入院时有明显感染症状、双胎妊娠、自身免疫性疾病、既往妊娠期糖尿病病史、妊娠期高血压、医源性早产等。

1.1.2 正常妊娠分娩组 纳入标准：根据上述，将分娩孕周≥37周定义为足月妊娠分娩，同时排除妊娠合并症及妊娠并发症，如双胎妊娠、全身感染、妊娠期糖尿病、妊娠期高血压等疾病病史。

以上纳入研究的对象均为居住在中国广东省广州地区汉族彼此间无亲缘关系的人群，均为2014年7月~2015年10月期间在我院住院治疗或分娩的孕产妇。

1.2 研究对象的临床资料和血清生化检测

严格根据上述标准纳入和排除研究对象，统计其相关资料，如年龄、籍贯、孕产史、孕前BMI、受孕方式、个人收入、受教育程度等，在征得患者同意后留取相关外周血液标本送往我院检验科行血细胞比容（HCT）、D-二聚体（DDI）、纤维蛋白原（Fg）、血清钙、白细胞（WBC）、糖化血红蛋白（HbA1c）等临床指标的血清学检测。

1.3 VDR基因FokⅠ多态性位点基因型的检测

本实验采用E.Z.N.A公司的Tissue DNA Kit试剂盒提取基因组DNA，用聚合酶链反应-限制性片断长度多态性（PCR-RFLP）方法检测目的基因的多态位点基因型。以100 ng DNA为模板在15 μL体系中进行PCR扩增目的基因。根据参考文献[16]设计引物，由英潍捷基公司合成引物，引物序列F: 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3'; R: 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'。PCR反应条件：94 ℃预变性5 min后进入循环，94 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，共35个循环，72 ℃终末延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳确认后，进行FokⅠ限制性核酸内切酶（Takara公司）水解，VDR基因PCR产物37 ℃酶切过夜。酶解产物经3%琼脂糖凝胶电泳，以Goldview核酸染料染色，在GelDoc2000凝胶成像仪下分析PCR产物以及酶切PCR产物，确定样本基因型。

1.4 统计学分析

本研究统计分析用SPSS 20.0软件完成。基因型分布作Hardy-Weinberg吻合度检验；组间计数资料比较采用χ^2检验；两组间计量资料比较采用独立样本的t检验，多组间计量资料样本均数比较采用单因素方差（ANOVA）分析；非正态分布的计量资料以中位数及范围表示，组间比较采用非参数检验（Mann-Whitney U检验，统计量Z）。所有检验水准P值均为0.05。

2 结果

2.1 研究对象一般情况

根据上述研究方法，最终纳入研究的早产组和足月分娩组病例例数分别为57例和84例。纳入研究对象的一般情况结果分析如下。

（1）年龄 早产组研究对象的平均年龄为28.81岁，足月组年龄为27.96岁，两组年龄未见明显统计学差异（t=-1.384，P=0.169）；（2）籍贯 早产组患者的籍贯包括有广东、广西、江西、湖北、湖南、福建、海南、贵州；足月组患者的籍贯包括有广东、广西、江西、湖北、湖南、福建、云南、贵州，两组间比较未见明显统计学差异；（3）孕产史 足月分娩组中，初产妇39例，经产妇45例。早产组中初产妇共25例，经产妇32例。两组分娩孕妇中均无既往早产史、无不良孕产史、无大月份引产史、无宫腔或宫颈手术史、无难产病史等可能导致早产发生的高危因素；（4）孕前BMI 早产组孕妇孕前BMI值为20.58±1.36 kg/m^2，足月组孕前BMI值为20.78±1.40 kg/m^2，两组间研究对象的孕前BMI比较无明显统计学差异（t=0.865，P=0.388）；（5）受孕方式、个人收入、受教育程度 两组研究对象的受孕方式、个人收入、受教育程度未见明显统计学差异（统计量Z值分别为-0.953、-0.101和-0.421，P值均大于0.05）。

2.2 研究对象的临床指标比较

早产组与足月妊娠分娩组在血细胞比容（HCT）、D-二聚体（DDI）、纤维蛋白原（Fg）、血清钙（Ca）、白细胞（WBC）、糖化血红蛋白（HbA1c）间的差异无统计学意义（P值均大于0.05）。早产组新生儿出生体质量低于足月妊娠分娩组，差异具有统计学意义（P<0.05，表1）。

2.3 VDR基因FokⅠ多态性限制性片段长度多态性（RFLP）分析

FokⅠ限制性内切酶酶切VDR基因的PCR扩增产物后，进行琼脂糖凝胶电泳，显性纯合子FF型不具有FokⅠ酶识别位点，显示为1条265 bp片段；隐性纯合子ff型具有FokⅠ酶识别位点，显示为2条分别为69 bp和196 bp的片段；杂合子Ff型的酶切产物则出现3个片段：69 bp、196 bp和265 bp。结果如图所示（图1）。

2.4 基因型及等位基因频率的分布情况

早产组和足月妊娠分娩组维生素D受体基因FokⅠ位点基因型的分布均符合Hard-Weinberg平衡（P>0.05）。早产组和足月分娩组基因型FF、Ff和ff频率分别为43.9%、35.1%、21.0%和19.0%、54.8%、16.2%。等位基因F、f频率在早产组和足月分娩组分别为61.4%、

表1 早产组和正常妊娠分娩组的临床特征比较

Tab.1 Comparison of general clinical data between preterm group and normal pregnancy group (*Mean*±*SD*)

Parameter	Full-term group (*n*=84)	Preterm group (*n*=57)	*t*	*P*
HCT (L/L)	0.35±0.03	0.34±0.03	1.606	0.111
DDI (mg/L)	3.44±1.02	2.63±0.89	1.294	0.198
Fg (g/L)	4.25±0.75	4.90±1.00	-1.679	0.454
Ca (mmol/L)	2.24±0.67	2.07±0.88	1.266	0.194
WBC (G/L)	12.56±1.22	13.34±0.98	1.398	0.346
HbA1c (%)	5.10±0.20	5.05±0.22	1.429	0.155
Weight of newborn (Kg)	3.01±0.56	2.09±0.47	11.728	0.003

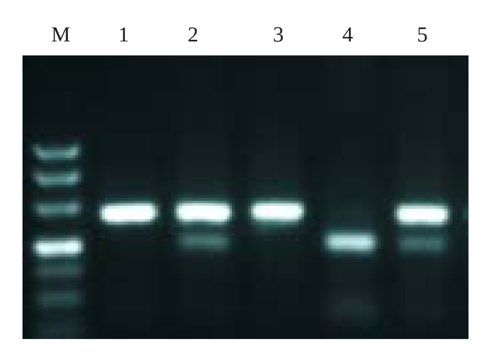


图1 VDR基因Fok Ⅰ位点酶切电泳图

Fig.1 Enzyme electrophoresis of VDR gene Fok I site. M: DL500 DNA Maker; Lanes 1, 3: FF genotype; Lanes 2, 5: Ff genotype; Lane 4: ff genotype.

38.6%和46.4%、53.6%。两组间基因型和等位基因频率差异均有统计学意义(P<0.05)。早产组中FF基因型频率明显高于足月组。以Ff和ff基因型为对照，FF基因型发生早产的风险增加(χ^2=9.701，P=0.002，OR=3.320，95% CI 1.560-7.066)(表2)。

2.5 早产组VDR基因Fok Ⅰ位点基因型与临床指标的关系

早产组各临床指标，如HCT、DDI、Fg、Ca、WBC、HbA1c、新生儿出生体质量，在VDR基因Fok Ⅰ位点不同基因型间比较未见明显统计学差异(P>0.05，表3)。

表2 早产组和足月产组VDR基因Fok Ⅰ等位基因型和基因频率分布表

Tab.2 Distribution of VDR gene Fok I site alleles and genotype frequencies in preterm and full-term group

	Total (*n*)	Geneotype frequency [*n* (%)]			Gene frequency [*n* (%)]	
		FF	Ff	ff	F	f
Full-term group	84	16 (19.0%)	25 (43.9%)	22 (16.2%)	78 (46.4%)	90 (53.6%)
Preterm group	57	25 (43.9%)	20 (35.1%)	12 (21.0%)	70 (61.4%)	44 (38.6%)
Full-term *vs* preterm		χ^2=10.369, *P*=0.006			χ^2=5.521, *P*=0.019	
FF *vs* Ff		χ^2=8.545, *P*=0.003				
FF *vs* ff		χ^2=3.931, *P*=0.047				
Ff *vs* ff		χ^2=0.079, *P*=0.779				
FF *vs* Ff+ff		χ^2=8.970, *P*=0.003				
FF+Ff *vs* ff		χ^2=0.249, *P*=0.618				

3 讨论

早产是妊娠期常见的严重并发症，其发病率呈现出逐年上升的趋势[17]。早产可对母体及新生儿造成严重的不良影响[18]。根据既往研究资料可知，早产与多种病理因素有关，但具体的病因和病理病生机制并未明确[2]。

目前研究指出，正常妊娠的维持与体内多种营养素的代谢有关，例如维生素D、硒、钙等。维生素D的生物学功能是通过VDR介导调节靶基因转录实现的，其活性形式是1,25(OH)$_2$D$_3$，VDR是介导1,25(OH)$_2$D$_3$发挥生物效应的核内生物大分子。越来越多研究发现基因

表3 早产组VDR基因FokⅠ位点基因型与临床指标比较分析
Tab.3 Comparison of alleles of VDR gene Fok site and clinical parameters in preterm group (*Mean*±*SD*)

Parameter	Genotypes of VDR gene			*F*	*P*
	FF	Ff	ff		
HCT (L/L)	0.35±0.03	0.34±0.02	0.34±0.05	0.191	0.826
DDI (mmol/L)	2.32±1.98	2.75±1.42	2.72±1.33	1.518	0.228
Fg (g/L)	4.45±0.98	5.10±0.56	5.15±0.74	0.020	0.980
Ca (mmol/L)	2.25±0.56	2.13±0.76	1.83±0.64	0.367	0.695
WBC (G/L)	12.9±0.65	13.57±0.67	13.55±0.59	0.967	0.452
HbA1c (%)	5.21±0.43	5.01±0.12	5.20±0.54	1.047	0.365
Weight of newborn (Kg)	2.14±0.44	1.93±0.30	2.20±0.32	0.463	0.632

的多态性可以编码出不同蛋白质,在人体内发挥不同生理效应。人群中VDR基因的变异可以影响维生素D生物效应的发挥。VDR基因位于人类第12号染色体长臂上,由9个外显子及多个内含子组成。其启动子区域较长,可启动多种具有组织特异性转录产物的合成。VDR基因不同的限制性核酸内切酶*Bsm*Ⅰ、*Aoa*Ⅰ、*Taq*Ⅰ以及*Fok*Ⅰ等酶切可以产生不同的基因型。5'端启动区域内的多态性位点影响mRNA的表达,3'端非翻译区的多态性位点影响mRNA的稳定性和蛋白质翻译的效率。人类VDR基因有两个潜在的起始转录位点,FokⅠ位点(rs2228570)多态性是由于VDR基因的第2外显子上第1个起始密码子ATG上的T/C发生变异所形成的,VDR基因表达时DNA翻译从第2个密码子开始,导致最终形成的蛋白质缺少3个氨基酸[19-20]。FokⅠ位点也被证实与人体内免疫系统的调节功能有关,也证明它参与早期胚胎植入过程的免疫调节。既往关于维生素D核受体基因多态性的研究已经证实VDR基因受体多态性与多种疾病的发生发展有关,如肠道癌症、肝癌[21]、胰岛素抵抗[22]、肥胖、2型糖尿病[23]等代谢性疾病。而成人代谢性疾病或特殊疾病状态同时也是早产发生的高危因素。

本研究通过分析84例足月妊娠分娩孕妇和57例早产患者VDR基因FokⅠ位点多态性分布特点,探讨VDR基因FokⅠ位点多态性与早产发生的相关性。研究结果显示,在纳入研究的全部妊娠妇女中,VDR基因FokⅠ位点基因型及等位基因在早产组和足月分娩组中分布差异有统计学意义(P<0.05),提示VDR基因多态性与早产发生风险相关,该结果与Lauren等[15]研究一致,并且进一步阐明VDR基因FokⅠ位点多态性是导致早产发生的潜在遗传因素。同时在与足月分娩组的比较中还发现早产组中VDR基因FokⅠ位点FF基因型明显高于足月分娩组,以Ff和ff基因型为对照,携带FF基因型发生早产的风险增高。这提示显示VDR基因FokⅠ位点多态性与早产遗传易感性相关,尤其是携带FF基因的人群。而进一步分析早产组间各临床指标在VDR基因FokⅠ位点不同基因型间并未存在明显差异,这在一定程度上说明FokⅠ位点多态性并非通过调节人体内凝血系统、血糖代谢功能等机制来影响早产的发生。

根据既往相关研究和本研究结果,维生素D和维生素D受体基因导致导致早产发生的机制仍无法完全明确。在妊娠妇女机体中,母体维生素D的状态及VDR基因多态性影响着子宫肌层的代谢和生长[24-25]。在包括胎盘在内的非骨骼肌肉组织中可发现有一定数量的维生素D_3受体和维生素D活化酶(1-α羟化酶)表达,这说明维生素D_3在子宫肌肉细胞和胎盘细胞的增殖和分化过程中发挥调节作用,同时也揭示VDR与胎儿-胎盘单位功能的发展和完善、和(或)在与胎盘和胎儿之间的交叉信号通路有一定的相关性[26]。1,25$(OH)_2D_3$的免疫调节功能也说明维生素D调节系统在胚胎植入时母体的免疫耐受状态发挥着重要作用[27]。

综上,本研究认为,VDR基因FokⅠ位点多态性与早产发生的遗传易感性相关,FF基因型可能是早产发生潜在致病因素。同时推测维生素D受体基因FokⅠ位点多态性是通过调节人体内维生素D的状态和不同环境因素下维生素D受体在胎盘上表达水平来影响早产的发生,但其相关的机制仍需要我们做进一步探索。

参考文献:

[1] 谢 幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 58-62.
[2] Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases[J]. Clin Chim Acta, 2006, 371(1/2): 1-12.
[3] Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Karimi F, et al. Correlation between vitamin D3 deficiency and insulin resistance in pregnancy [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2007, 24(1): 27-32.
[4] Aslani S, Hossein-Nezhad A, Mirzaei K, et al. VDR FokI polymorphism and its potential role in the pathogenesis of

gestational diabetes mellitus and its complications[J]. Gynecol Endocrinol, 2011, 27(12): 1055-60.

[5] Park SH, Lee GM, Moon JE, et al. Severe vitamin D deficiency in preterm infants: maternal and neonatal clinical features[J]. Korean J Pediatr, 2015, 58(11): 427-33.

[6] Mojibian M, Soheilykhah S, Fallah Zadeh MA, et al. The effects of vitamin D supplementation on maternal and neonatal outcome: A randomized clinical trial[J]. Iran J Reprod Med, 2015, 13(11): 687-96.

[7] Burris HH, Camargo C. Vitamin D and gestational diabetes mellitus[J]. Curr Diab Rep, 2013, 14(1): 451.

[8] Robinson CJ, Wagner CL, Hollis BW, et al. Association of maternal vitamin D and placenta growth factor with the diagnosis of early onset severe preeclampsia[J]. Am J Perinatol, 2013, 30(3): 167-72.

[9] Robinson CJ, Wagner CL, Hollis BW, et al. Maternal vitamin D and fetal growth in early-onset severe preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 204(6): 556. e1-4.

[10] Hensel KJ, Randis TM, Gelber SE, et al. Pregnancy-specific association of vitamin D deficiency and bacterial vaginosis[J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 204(1): 41. e1-9.

[11] Bodnar LM, Platt RW, Simhan HN. Early-pregnancy vitamin D deficiency and risk of preterm birth subtypes[J]. Obstet Gynecol, 2015, 125(2): 439-47.

[12]王 玥, 赵 琳. 孕产妇维生素D缺乏与早产的关系[J]. 中国妇幼健康研究, 2015, 13(3): 638-40.

[13] Wagner CL, Mcneil R, Hamilton SA, et al. A randomized trial of vitamin D supplementation in 2 community health center networks in South Carolina[J]. Am J Obstet Gynecol, 2013, 208(2): 137. e1-13.

[14] Bodnar LM, Platt RW, Simhan HN. Early-pregnancy vitamin D deficiency and risk of preterm birth subtypes[J]. Obstet Gynecol, 2015, 125(2): 439-47.

[15] Manzon L, Altarescu G, Tevet A, et al. Vitamin D receptor polymorphism FokI is associated with spontaneous idiopathic preterm birth in an Israeli population[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014(7): 84-8.

[16]夏 征, 胡亚卓, 张红红, 等. 维生素D受体基因Fok Ⅰ及*Bsm* Ⅰ多态性与老年男性2型糖尿病脂代谢异常的相关性[J]. 南方医科大学学报, 2014(11): 1562-8.

[17] Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter[J]. Mol Endocrinol, 1997, 11(8): 1165-79.

[18] Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(6): 915-21.

[19]侯丽君, 唐先格, 亓文波. 糖耐量减低患者维生素D、维生素D受体基因FokI多态性与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(7): 586-9.

[20] Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alkharfy KM, et al. Association of VDR-gene variants with factors related to the metabolic syndrome, type 2 diabetes and vitamin D deficiency[J]. Gene, 2014, 542(2): 129-33.

[21] Barrera D, Díaz L, Noyola-Martínez N, et al. Vitamin D and inflammatory cytokines in healthy and preeclamptic pregnancies[J]. Nutrients, 2015, 7(8): 6465-90.

[22] Viganò P, Lattuada D, Mangioni S, et al. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system[J]. J Mol Endocrinol, 2006, 36(3): 415-24.

[23] Cho GJ, Hong SC, Oh MJ, et al. Vitamin D deficiency in gestational diabetes mellitus and the role of the placenta[J]. Am J Obstet Gynecol, 2013, 209(6): 560. e1-8.

[24] Flood-Nichols SK, Tinnemore D, Huang RR, et al. Vitamin D deficiency in early pregnancy[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123763.

[25] Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004 (89-90): 187-93.

[26] Van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system[J]. Eur J Immunol, 2007, 37(2): 395-405.

[27] Knabl J, Hüttenbrenner R, Hutter S, et al. Gestational diabetes mellitus upregulates vitamin D receptor in extravillous trophoblasts and fetoplacental endothelial cells[J]. Reprod Sci, 2015, 22(3): 358-66.

（编辑：吴锦雅）